

基于多特异性结合策略的抗病毒药物研究进展

周洋[#], 徐淑静[#], 丁当, 王硕, 刘新泳, 展鹏^{*}

(山东大学药学院药物化学研究所, 化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 为应对病毒耐药株的不断涌现和新型病毒感染性疾病的暴发, 基于新策略的抗病毒药物研发成为重要且紧迫的研究课题。近年来, 快速发展的多特异性结合策略已成为研究的焦点, 并在抗病毒领域得到了广泛应用。本文从药物化学角度综述了多特异性结合策略在抗病毒领域的前沿进展, 并对其面临的挑战及未来前景进行了讨论。

关键词: 病毒; 多特异性结合策略; 抗病毒药物; 药物化学; 药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2203-15

Recent advances of antiviral drugs based on multispecific binding strategy

ZHOU Yang[#], XU Shu-jing[#], DING Dang, WANG Shuo, LIU Xin-yong, ZHAN Peng^{*}

(Department of Medicinal Chemistry, Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education),
School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: To address the continuous emergence of drug-resistant strains of viruses and the outbreaks of novel virus infections, developing new antiviral drugs based on novel strategies has become an important and urgent research topic. In recent years, the rapidly developing multi-specific binding strategy has become a focus and been widely applied in antiviral. This review summarizes the recent progress of the multi-specific binding strategy in the antiviral field from the perspective of medicinal chemistry and discusses existing challenges as well as future opportunities for antiviral drug discovery.

Key words: virus; multispecific binding strategy; antiviral drug; medicinal chemistry; drug design

病毒感染性疾病严重危害人类健康与社会发展。冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 造成的新型冠状病毒感染 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 夺去了数百万人的生命, 对人类健康和公共卫生安全带来了重大影响^[1-2]。人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV)、流感病毒 (influenza virus)、乙肝病毒 (hepatitis B virus)、埃博拉病毒 (Ebola virus) 等引发的传染性疾病预防也亟待解决^[3-6]。此外, 随着耐药性毒株的不断涌现, 世

界正在面临着病毒感染的重大挑战^[7-9]。因此, 迫切需要新的策略来预防和治疗当前以及未来可能出现的病毒感染性疾病。

自20世纪70年代, 药物设计逐渐发展为“一药一靶”的模式, 据此数百种药物应运而生。经典的药物设计一般是先明确一个靶点, 然后针对该靶点进行药物筛选和设计; 药物与靶点直接结合, 通过促进或者抑制靶点的功能来发挥作用; 另外, 经典药物通常在全身发挥作用, 不具有组织特异性。与之不同的是, 多特异性结合策略是在经典理性药物设计的基础上, 增加了另外一重功效: 一种是将靶点定位到细胞特定的效应器, 使该效应器对靶标进行调节, 比如蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTAC); 另一种是让药物在特定位点发挥作用, 目的主要是减少药物不良

收稿日期: 2023-04-28; 修回日期: 2023-05-27.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173677); 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0539

反应, 比如抗体药物偶联物 (antibody-drug conjugate, ADC)^[10]。近年来, 快速发展的多特异性药物已成为研究热点^[11,12], 本文以药物化学的角度, 从 PROTAC、抗体募集分子 (antibody recruiting molecule, ARM)、ADC、抗病毒药物递送系统和核糖核酸酶靶向嵌合体 (ribonuclease targeting chimera, RIBOTAC) 等方面总结了抗病毒药物研发的多特异性结合策略 (图 1), 以期对当下及未来的抗病毒药物研发提供指导。

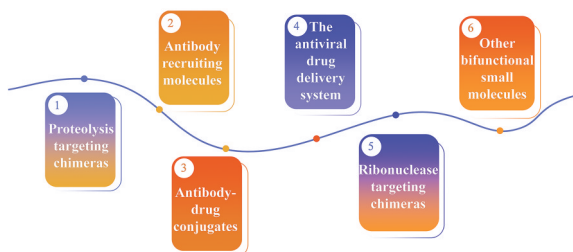


Figure 1 Outline of multi-specific binding strategies in the anti-viral field

1 蛋白水解靶向嵌合体

PROTAC 的概念最早是在 2001 年由 Craig Crews 教授及合作者提出^[13]。它能够利用生物体内天然存在的蛋白清理系统, 降低蛋白水平而非抑制其功能, 从而达到治疗疾病的目的。PROTAC 分子是一种异双功能分子, 由三部分构成: 目标蛋白 (protein of interest, POI) 配体、E3 泛素连接酶 (E3 ubiquitin ligase, E3) 配体及二者中间的连接链 (图 2)^[14]。E3 泛素连接酶配体包括诸多类型, 其中, cereblon (CRBN)、von Hippel-Lindau (VHL)、三重基序蛋白 25 (tripartite motif-containing protein 25, TRIM25) 及鼠双微体 2 (murine double minute 2, MDM2) 目前最为常见^[15,16]。另外, 连接链 (linker) 的性质对 PROTAC 的结构刚性、疏水性和溶解性均有很大的影响, 烷基链和聚乙二醇 (PEG) 链最为常用^[17]。PROTAC 降解 POI 经泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 实现, 其大致过程如下: PROTAC 分子一端与 POI 结合, 另一端招募 E3 泛素连接酶, 形成三元复合物。之后 E3 泛素连接酶介导泛素从 E1 活化酶 (E1 ubiquitin-activating enzyme, E1) 和 E2 结合酶 (E2 ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 转移到 POI, 多泛素化的 POI 被细胞内蛋白酶体识别并降解^[18,19]。PROTAC 分子则被释放出来, 参与下一个 POI 的降解过程。相较于需在体内具备较高的浓度才能够占据靶标活性位点的传统小分子, PROTAC 以一种“事件驱动”的作用模式, 在催化量即可发挥作用, 从而避免产生药物的脱靶毒性^[20,21]。PROTAC 还能够在“不可成药蛋白”上解决小分子难以实现的靶向性问题, 例

如细胞内的支架蛋白、转录因子调节蛋白或者表观遗传相关蛋白^[22]。此外, 耐药性是小分子抑制剂在临床应用过程中不可避免的问题, PROTAC 只需与活性位点弱结合, 在克服药物耐药性方面的优势也逐渐显现^[23,24]。近年来, PROTAC 策略已逐渐应用于抗病毒药物领域。

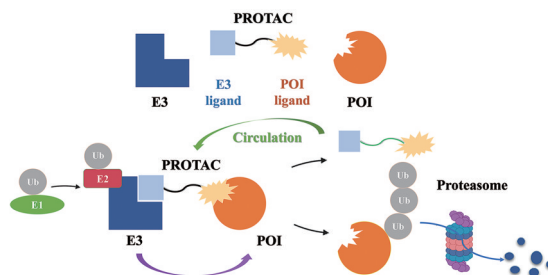


Figure 2 A mechanistic overview of PROTAC-mediated protein degradation. PROTAC: Proteolysis targeting chimera; E3: E3 ubiquitin ligase; E1: E1 ubiquitin-activating enzyme; E2: E2 ubiquitin-conjugating enzyme; POI: Protein of interest; Ub: Ubiquitin

2014 年, Montrose 等^[25]报道了一项关于 PROTAC 技术在降低 HBV X 蛋白含量方面的研究, 其中, 新型细胞渗透性 PROTAC (**1**, 图 3) 效果显著。此化合物包括 X 蛋白 N 端的寡聚化结构域 (oligomerization domain)、X 蛋白 C 端的不稳定结构域 (instability domain) 以及融合聚精氨酸细胞穿透肽 (polyarginine cell-penetrating peptide, CPP) 三部分 (图 3)。寡聚化结构域能够拮抗 X 蛋白的促凋亡功能, CPP 提高 PROTAC 的细胞渗透性, 不稳定结构域使 X 蛋白成为蛋白酶体降解的目标。研究显示, **1** 在 HepG2 肝癌细胞中可降解表达全长和 C 端截断两种形式的 X 蛋白。然而, 这种基于肽的 PROTAC 在抑制 HBV 复制和治疗慢性肝炎方面仍需进一步研究。

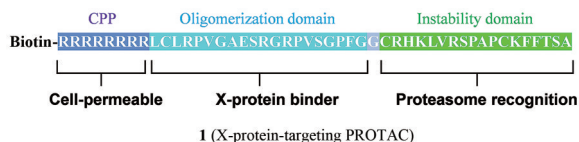


Figure 3 Sequence of the X-protein-targeting PROTAC. CPP: Polyarginine cell-penetrating peptide

Telaprevir (**2**, 图 4) 是首个直接靶向丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) NS3/4A 蛋白酶的可逆共价抑制剂, 然而, 它与靶标亲和力低, 且易产生耐药性^[26,27]。为解决上述缺陷, 2019 年, de Wispelaere 等^[28]根据 telaprevir 与 HCV NS3/4A 蛋白酶的晶体结构 (PDB code: 3SV6), 选择在 telaprevir 溶剂开口区的吡嗪环上连接 CRBN 配体, 进而设计出了靶向降解病毒蛋白的 PROTAC 分

子 DGY-08-097 ($EC_{50} = 748 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **3**, 图 4)。蛋白质印迹实验 (Western blot assay) 和基于定量质谱的蛋白质组学研究表明, **3** 以浓度依赖性的方式降低细胞内 NS3 蛋白, 且具有抑制和降解的双重作用。此外, **3** 保留对两种突变体 (HCV-NS3-V55A 和 HCV-NS3-A156S) 的活性, 在一定程度上解决了 telaprevir 的耐药性问题。该研究验证了 PROTAC 是抗病毒药物研发的一种有效策略。

2022 年, Li 等^[29] 以靶向血凝素 (hemagglutinin, HA) 的齐墩果酸 (oleanolic acid, OA, **4**, 图 5) 为 POI 配体, 选择 CRBN (化合物 C1~C3, **5**, 图 5) 和 VHL (化合物 V1~V6, **6**, 图 5) 两种 E3 连接酶进而设计出了两类新型五环三萜类 PROTAC 分子, 实现了此技术在抗流感领域的首次应用。机制验证实验显示, V3 对 HA 具有浓度依赖性的降解作用 ($EC_{50} = 1.44 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且降解过程依赖蛋白酶体。高分辨质谱分析光交联复合物实验进一步证明, **4** 倾向于在非活性位点结合, 而 V3 能够以降解的全新模式发挥抗病毒作用, 而不是抑制它的功能。

2022 年, Xu 等^[30] 基于现有抗流感病毒上市药物神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抑制剂奥司他韦 (oseltamivir, OSV, **7**, 图 6) 设计出了 PROTAC 化合物 **8e** (**8**, 图 6)。在 MDCK 细胞中, 该化合物对野生型流感病毒株 H1N1 显示出较好的活性和较低的细胞毒性 ($EC_{50} = 0.33 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 50 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。蛋白质印迹实验显示, **8** 能够显著降低 NA 的表达水平, 且阴性对照化合物 8e-neg (**9**, 图 6) 不具有该作用, 这提示 **8** 的抗病毒活性可能是由 NA 降解引起的。进一步的机制验证实验表明, **8** 是通过泛素-蛋白酶体途径以浓度依赖性的方式来降解 NA。此外, 它还能够有效对抗

OSV 耐药 H1N1 毒株 (H1N1 H274Y), 这同样证实了 PROTAC 策略有望解决抗病毒药物的耐药性问题。

2022 年, Zhao 等^[31] 报道了一种名为 APL-16-5 ($EC_{50} = 0.28 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **10**, 图 7) 的抗甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV) 微生物代谢物。机制实验显示, **10** 与 E3 泛素连接酶 TRIM25 和 IAV 聚合酶 PA 亚基结合, 从而导致 PA 蛋白的泛素化, 最终在蛋白酶体中降解。因此, **10** 通过蛋白酶体依赖性的方式诱导流感病毒 PA 降解。

周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 抑制剂 SNS032 ($EC_{50} = 0.105 \pm 0.004 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **11**, 图 8) 具有显著的抗人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 活性^[32,33]。2021 年, Hahn 等^[33] 以 **11** 为先导化合物设计了一种抗 HCMV 的 PROTAC 分子 THAL-SNS032 ($EC_{50} = 0.025 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 0.125 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **12**, 图 8)。12 是由 **11** 通过连接链连接 CRBN 配体沙利度胺得到的 PROTAC 分子。蛋白质印迹实验表明, **12** 在低细胞毒性条件下浓度依赖性降解 CDK, 并显示出一定的广谱抗病毒活性 (murine human cytomegalovirus, MCMV, $EC_{50} = 0.21 \pm 0.09 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 1.00 \pm 0.22 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; SARS-CoV-2, $EC_{50} = 0.11 \pm 0.02 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 64.9 \pm 16.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3CL^{pro} (3C-like protease, 又称 major protease, M^{pro}) 是冠状病毒中一种重要的非结构蛋白, 在子代病毒的复制和转录中发挥重要作用。2022 年, 盘龙药业对 3CL^{pro} 候选药物 PLC-01 (**13**, 图 9) 运用蛋白降解的新机制设计出了两类 PROTAC 分子, 这是在冠状病毒领域的首次报道^[34,35]。研究者以不同 linker 将 **13** 分别与 CRBN 配体沙利度胺以及 VHL 配体得到 6 个系列 PROTAC 分子。

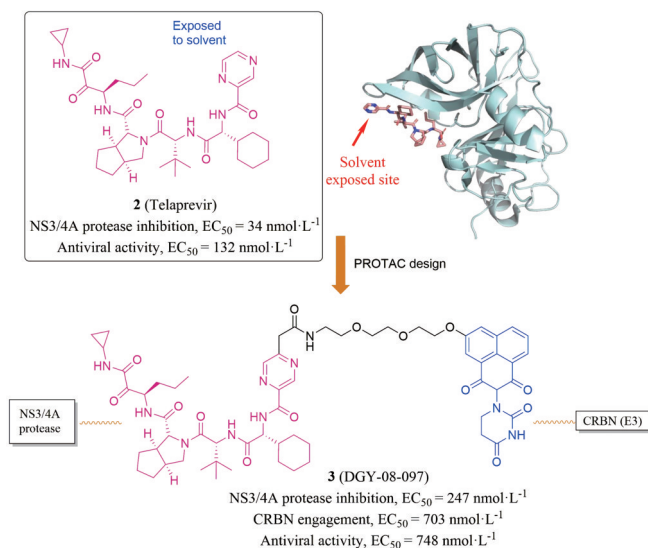


Figure 4 Chemical structures of **2**, **3** and co-crystal structure of **2** bound to the HCV NS3/4A protease complex (PDB code: 3SV6); CRBN: Cereblon

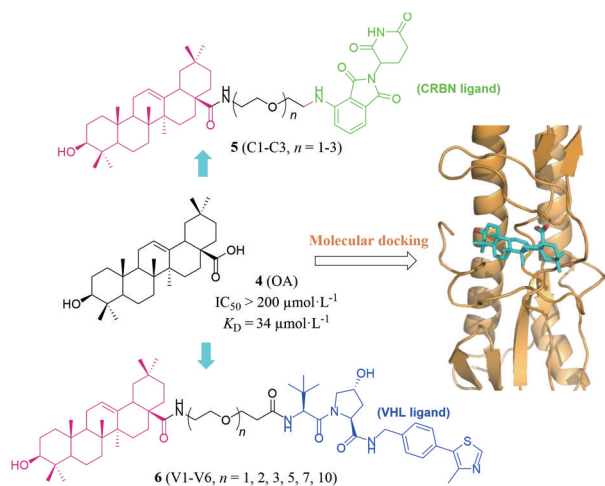


Figure 5 Chemical structures of 4–6 and the docking model of 4 binding within the HA protein (PDB code: 1RVT). OA: Oleanolic acid; VHL: von Hippel-Lindau

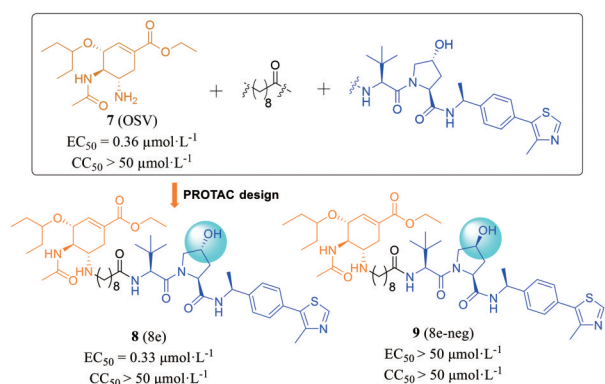


Figure 6 Chemical structures of 7–9

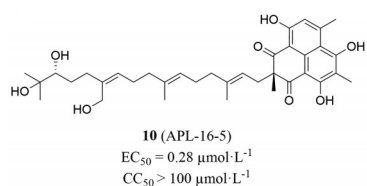


Figure 7 Chemical structure of 10

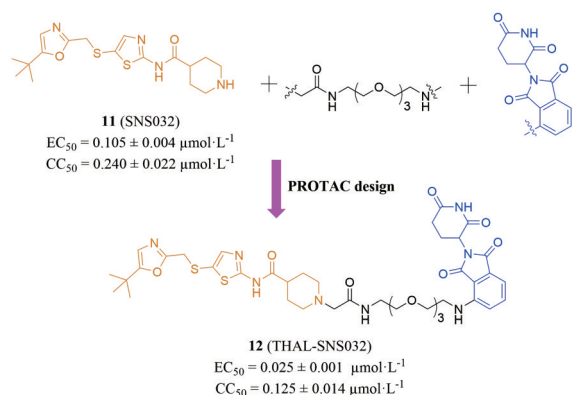


Figure 8 Chemical structures of 11 and 12

荧光共振实验和蛋白质印迹实验显示,部分 PROTAC 分子 (即 14~23, 图 9) 对 3CL^{pro} 既有抑制活性 ($IC_{50} = 50 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 又有良好的降解活性 ($DC_{50} = 50 \sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2 抗体募集分子

抗体 (antibody, Ab) 与抗原 (antigen, Ag) 特异性识别并结合是生物医药治疗的基础。根据产生的途径不同, 抗体可分为外源性抗体和内源性抗体。内源性抗体是人类在生活中接触非自身抗原而产生的天然抗体, 存在于人体血液中, 包括 IgM 和 IgG 等^[36]。人类血清中主要含有抗二硝基苯衍生物 (dinitrophenol, DNP) 抗体、抗 L-鼠李糖 (L-rhamnose, Rha) 抗体、抗 α -Gal 抗体和醛缩酶抗体 (aldolase antibody) 等^[37]。近年来研究表明, 把内源性抗体募集到靶细胞表面, 可激活免疫系统识别被感染细胞, 并通过其 Fc 端介导的免疫机制杀伤靶细胞^[38]。ARM 正是根据这一概念发展起来的一类新型分子。它是一类双特异性小分子, 由三个结构域组成: 抗体结合端 (antibody-binding terminus, ABT)、靶向结合端 (target-binding terminus, TBT) 和连接二者的 linker (图 10A)^[39]。ARM 首先介导内源性抗体与致病因子 (例如蛋白质、病毒或被感染细胞) 形成三元复合物, 进而招募抗体或不同免疫效应细胞, 最后通过以下几种免疫机制诱导靶细胞的清除 (图 10B)^[40]。第一, 在补体介导的细胞毒作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 中, 内源性抗体的 Fc 端与补体 C1q 结合, 会在靶细胞表面形成膜攻击复合物 (membrane attack complex, MAC), 造成细胞外离子大量内流, 引起靶细胞裂解 (包括被感染细胞、肿瘤细胞等)^[41]。第二, 内源性抗体的 Fc 端也可以与免疫细胞的表面受体, 如细胞的 Fc γ 受体 (Fc fragment γ receptor, Fc γ R) 相互作用, 从而引发免疫反应^[42]。第三, 吞噬细胞也可通过抗体依赖性细胞吞噬作用 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) 杀伤靶细胞^[43]。第四, 在抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 中, Fc 段通过与效应细胞表面的 Fc 受体 (如 Fc γ RIIIa/CD16) 结合, 介导效应细胞杀伤靶细胞 (肿瘤细胞、被感染的细胞、致病性免疫细胞等)^[44]。近年来, 基于抗体募集的多特异性结合策略逐渐应用于抗病毒领域。

HIV 感染需要病毒包膜 (envelope, Env) 和宿主细胞膜之间的融合, 该过程由 Env 糖蛋白 gp120 (glycoprotein120) 和 gp41 (glycoprotein41) 介导。gp120 负责与细胞表面受体 CD4 和辅助受体 CCR5 或 CXCR4 结合, 跨膜亚基 gp41 中 C 端的七肽重复序列区域 (C-terminal heptad repeat region, CHR) 与 N 端七肽重复序列区域

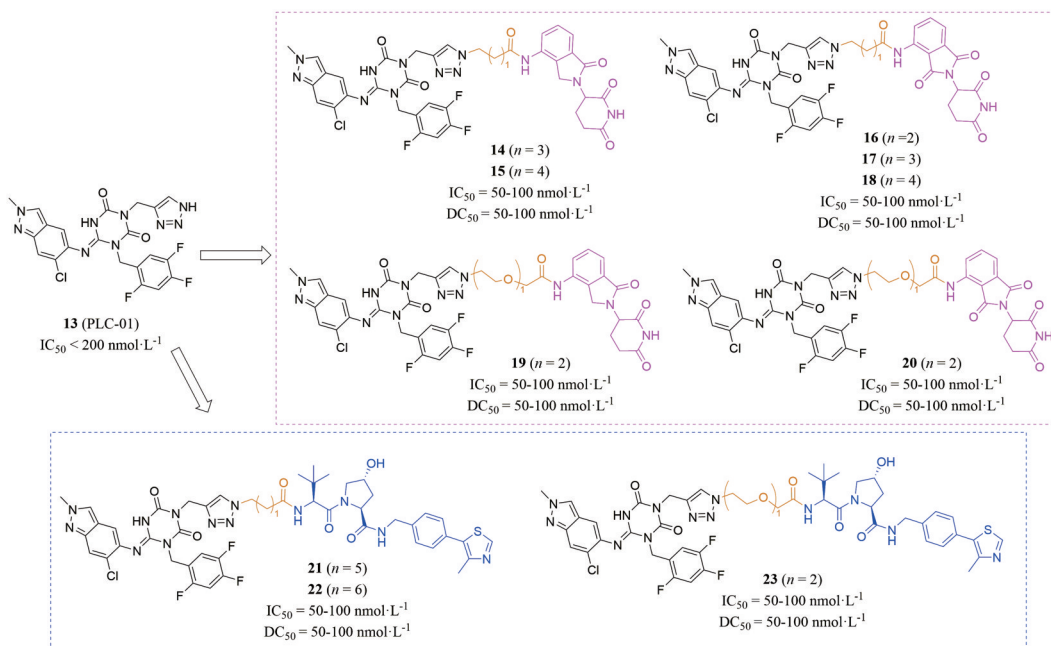


Figure 9 Chemical structures of 13–23

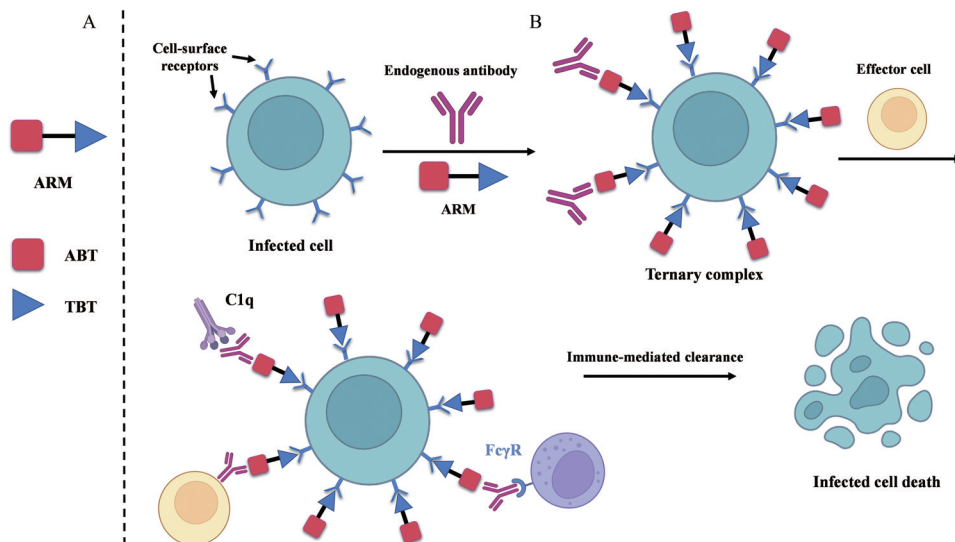


Figure 10 Composition of an ARM: ABT and TBT (A) and action mode of ARMs (B). ARM: Antibody recruiting molecule; ABT: Antibody-binding terminus; TBT: Target-binding terminus; Fc γ R: Fc fragment γ receptor

(N-terminal heptad repeat region, NHR) 组装成六螺旋束 (six-helix bundle, 6HB), 进而介导病毒与宿主细胞之间的膜融合。重要的是, 阻断膜融合过程可有效抑制 HIV 复制^[45,46]。2009 年, Parker 等^[47]以膜融合抑制剂 BMS-378806 为先导化合物 (24, 图 11), 运用抗体募集策略设计了一种治疗 HIV 的抗体募集分子 ARM-H (25, 图 11)。25 由 24 通过 linker 连接 DNP 而得。酶联免疫吸附实验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 表明, 25 结合病毒糖蛋白 gp120, 进而抑制与 CD4 的相互作用 (25, $IC_{50} = 8.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 24, $IC_{50} = 1.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

研究者进一步评价了它们对 HIV-1 进入人 MT-2 T 细胞的抑制作用 (25, $EC_{50} = 6.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 24, $EC_{50} = 0.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 且 25 未表现出细胞毒性。此外, 25 能够浓度依赖性地募集抗 DNP 抗体, 形成 gp120、25 和抗 DNP 抗体三元复合物, 进而激活免疫系统的 CDC 介导被感染细胞死亡。2014 年, 该团队^[48]结合药物化学、生物化学和细胞测定分析以及计算化学提供了一种优化的 ARM-H 模拟物 (MT-2 T cell $EC_{50} = 0.013 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CD4 inhibition $IC_{50} = 0.330 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, Ab recruiting $EC_{50} = 1.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 26, 图 11), 它能够抑制病毒复制

(MT-2 T细胞), 并且结合 gp120 和招募 Ab 的效力均比 **25** 强 (MT-2 T cell $EC_{50} = 12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CD4 inhibition $IC_{50} = 19.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, Ab recruiting $EC_{50} = 37.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。综上, **25** 和 **26** 的独特之处在于, 它们代表了一种基于抗体募集的多特异性结合策略, 并通过两种相互增强的机制干扰病毒复制过程——既能阻止病毒进入, 又能靶向表达 Env 糖蛋白的细胞进行免疫识别和免疫清除。

NA 本质上是抗原性的, 可以通过有效的半抗原修饰来增强它们的免疫原性, 继而使机体产生免疫应答以清除被感染细胞。2020 年, Liu 等^[49]通过将 NA 抑制剂扎那米韦 (A/Wisconsin/629-D00015/2009 H1N1 pdm09, $K_D = 0.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; A/Netherlands/22/2003 H3N2, $K_D = 1.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B/Florida/4/2006 Yamagata Lineage, $K_D = 2.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B/Brisbane/60/2008 Victoria Lineage, $K_D = 7.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, zanamivir, ZNV, **27**, 图 12) 与高免疫原性半抗原 DNP 结合设计出了扎那米韦-DNP 偶联物 (zanamivir-DNP conjugate, zan-DNP, **28**, 图 12)。SPR 实验及共聚焦显微照片显示, **28** 不仅与 NA 具有较强的结合力 (A/Wisconsin/629-D00015/2009 H1N1 pdm09,

$K_D = 0.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; A/Netherlands/22/2003 H3N2, $K_D = 1.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B/Florida/4/2006 Yamagata Lineage, $K_D = 21.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B/Brisbane/60/2008 Victoria Lineage, $K_D = 58.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 还可浓度依赖性地募集抗 DNP 抗体。它可以抑制甲型和乙型流感病毒的 NA, 同时向病毒感染的细胞募集抗 DNP 抗体, 调动免疫系统的 CDC 和 ADCC 攻击病毒或被感染细胞。此外, **28** 对感染了 100 倍 MLD_{50} 病毒的小鼠单剂量给药可根除甲型和乙型流感病毒代表性毒株 (a/Puerto Rico/8/1934, H1N1; A/Puerto Rico/8/1934, Reassortant X-31, H3N2; A/California/07/200, H1N1 pdm09; B/Florida/4/2006) 的晚期感染, 并且对严重感染长达 3 天的小鼠仍有效, 因此该多特异性药物可能成功治疗当前疗法难以治愈的流感病毒感染。

3 抗体药物偶联物

ADC 是新一代以大分子为载体的靶向药物, 由 Ab 和小分子细胞毒药物 (cytotoxic drugs) 和连接链构成。它利用抗体的靶向性特异性识别靶细胞表面的抗原, 将细胞毒药物高效地运送至靶细胞内部, 并通过体

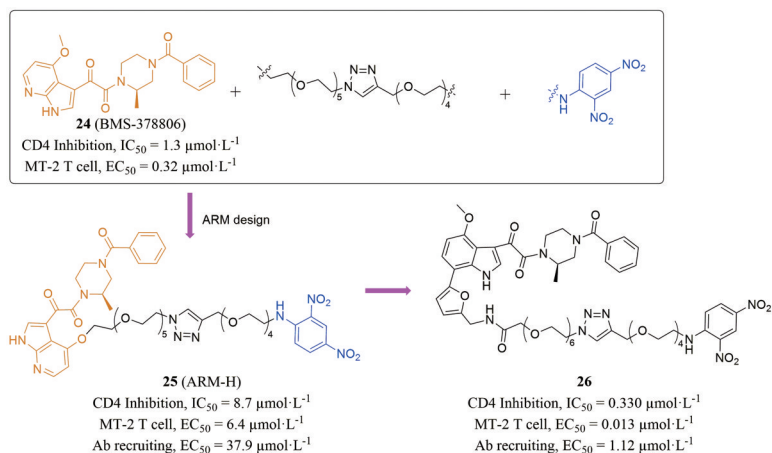


Figure 11 Chemical structures of 24–26

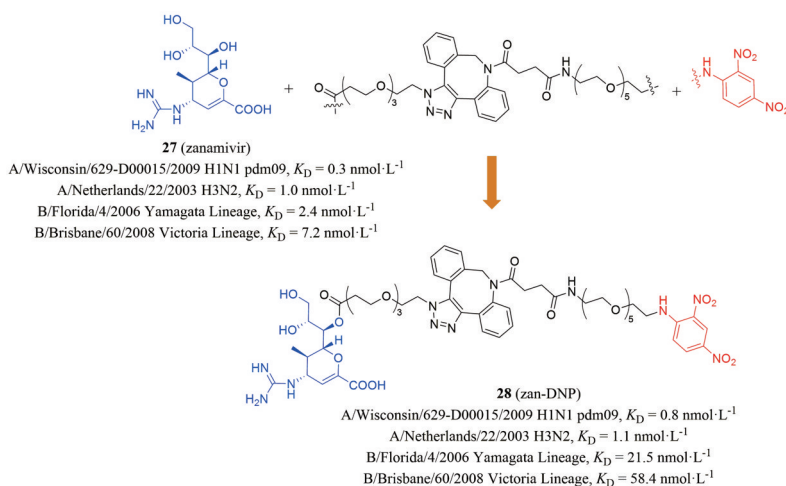


Figure 12 Chemical structures of 27 and 28

内多种免疫机制杀伤靶细胞^[50]。与 ARMs 不同, ADC 与抗体以共价结合的方式杀伤靶细胞, 其独特的组成方式, 使其药代动力学、药效学以及耐药机制均不同于其他类型的药物。近年来, 抗体药物偶联的策略已逐渐应用于抗病毒药物领域。

辅助受体 CCR5 是病毒与被感染细胞融合过程中的关键受体。2010 年, Gavrilyuk 等^[51]将 CCR5 抑制剂 Aplaviroc (**29**, 图 13) 通过 linker 连接羧醛酶抗体 38C2 (aldolase antibody 38C2, 又称 mAb 38C2) 设计并合成了 38C2-Aplaviroc 偶联物 (38C2-Aplaviroc, **30**, 图 13)。流式细胞术实验与中和测定实验证明, **30** 可以与 HIV、猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 及人猴嵌合免疫缺陷病毒 (simian/human immunodeficiency virus, SHIV) 辅助受体 CCR5 结合, 并能够有效抑制病毒

进入靶细胞 (HIV-1_{JR-FL} IC₅₀ = 0.57 nmol·L⁻¹; SIV_{mac239} IC₅₀ = 0.1 nmol·L⁻¹; SHIV_{162P3} IC₅₀ = 0.89 nmol·L⁻¹)。该研究证明了抗体药物偶联的策略在抗病毒领域的应用潜力。

2013 年, Sato 等^[52]报道了一项基于 HIV 膜融合抑制剂 BMS-378806 (**24**, 图 11) 和 BMS-488043 (**31**, 图 14) 构建 ADC 的研究。研究人员合成了两个膜融合抑制剂 **24** 和 **31** 的 *N*-酰基- β -内酰胺衍生物 **32** (图 14) 和 **33** (IC₅₀ = 67.5 nmol·L⁻¹, 图 14), 二者进一步结合 mAb 38C2 得到了两个缀合物, 即 ADC **34** (图 14) 和 **35** (IC₅₀ = 128 nmol·L⁻¹, 图 14)。其中, **32** 和 **34** 均无显著活性, 但 **33** 和 **35** 能够有效抑制 HIV 感染。这说明了 **31** 具有构建 ADC 的连接位点, 能够成功偶联抗体并可能促进新型双特异性抗体的开发。

2014 年, Asano 等^[53]在 CCR5 抑制剂 Maraviroc

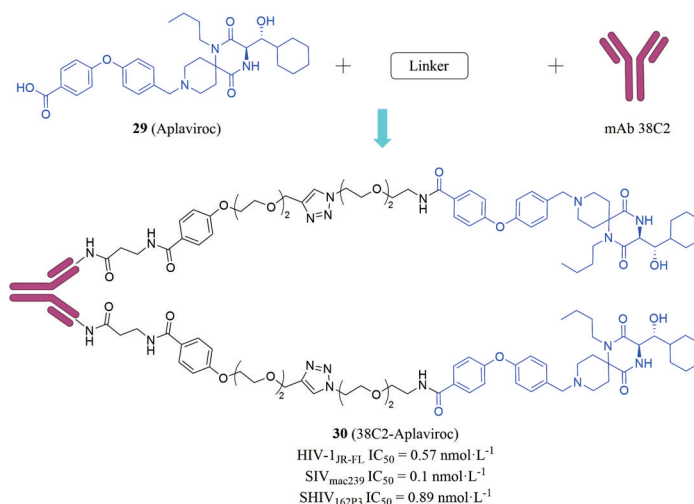


Figure 13 Chemical structures of **29** and **30**. mAb 38C2: Aldolase antibody 38C2

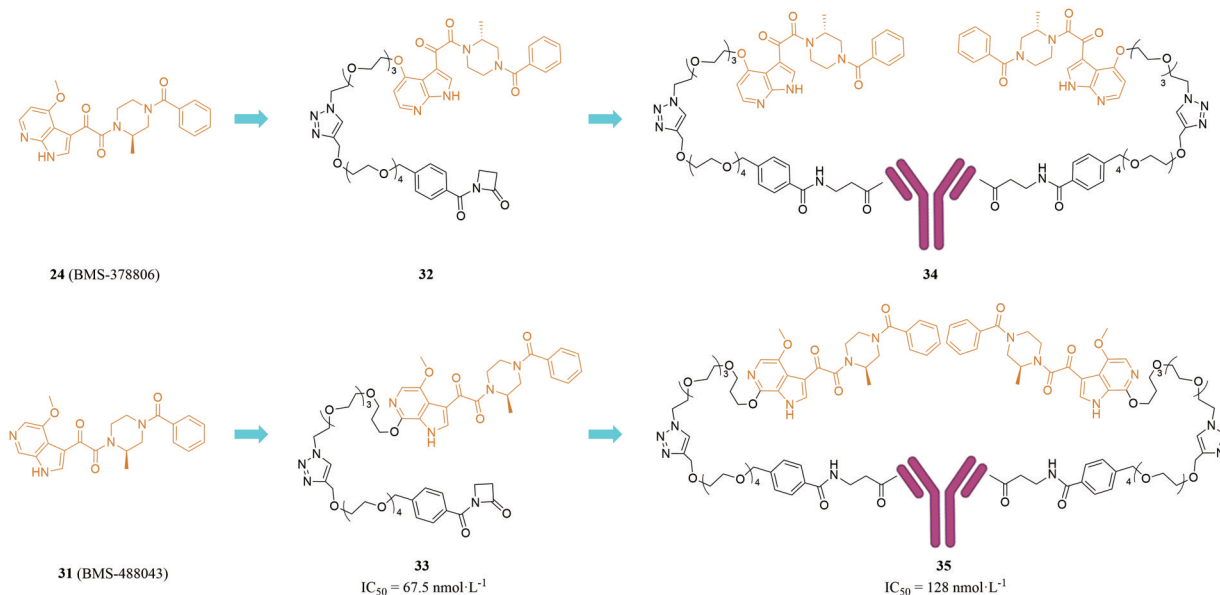


Figure 14 Chemical structures of **24** and **31**-**35**

(HIV-1_{JR-FL} IC₅₀ = 1.6 ± 0.25 nmol·L⁻¹, **36**, 图 15) 上找到了有效的连接位点, 通过 linker 将其与 mAb 38C2 连接, 设计出了 Maraviroc 的 ADC **37** (HIV-1_{JR-FL} IC₅₀ = 19 ± 2.6 nmol·L⁻¹, 图 15) 和 **38** (HIV-1_{JR-FL} IC₅₀ = 7.7 ± 0.50 nmol·L⁻¹, 图 15)。其中, **36** 在三唑环处衍生的 **38** 不会显著丧失活性。因此, 该研究发现了 **36** 的可行结合位点, 并成功运用了抗体药物偶联的多特异性结合策略来发挥抗病毒作用。

此外, 再生元制药公司和 Cidara Therapeutics 公司研发的两类新型 ADC 也有望成功用于抗流感药物的开发^[54, 55]。综上, 抗体药物偶联物在抗病毒领域具有巨大前景。

4 抗病毒药物递送系统

4.1 核酸递送分子

随着 SARS-CoV-2 更具传播性突变体的出现, 开发能够快速适应病毒不断变异的抗病毒药物日益迫切^[56]。SARS-CoV-2 是一种正链单链 RNA 病毒, 通过人类血管紧张素转换酶 2 (human angiotensin-converting enzyme 2, hACE2) 受体进入宿主细胞, 且病毒基因组 RNA 通过亚基因组 mRNA 的复制, 实现病毒蛋白的生物合成。研究发现, 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 可同时靶向这两种 RNA, 实现双重基因沉默^[57]。siRNA 作为一种核酸药物, 可与多肽、抗体或其他小分子直接连接形成核酸递送分子, 进而改变其体内分布及代谢动力学等性质, 帮助 siRNA 进入到特定的组织和细胞内^[58]。2022 年, Traube 等^[59]报道了靶向 SARS-CoV-2 化学稳定的 siRNA 的设计与合成。研究人员在 siRNA 的 3' 端整合了一个炔烃部分, 通过 Cu(I) 催化的点击化学对 siRNA 进一步化学修饰。按照这个策略, siRNA 可以与宿主细胞受体 hACE2 配体缀合得到 siRNA 修饰物, 即 siRNA 与 hACE2 结合肽的偶联物

(**39**, 图 16A), 从而实现靶向递送。研究表明, hACE2 结合肽偶联的 siRNA 能够减少 3D 黏膜纤毛肺微组织中的病毒复制和病毒诱导的细胞凋亡。综上, 通过点击化学将 siRNA 与受体配体结合的模式有助于特异性递送 siRNA, 进而发挥抗病毒作用。

4.2 胆固醇缀合分子

胆固醇在真核细胞膜中含量丰富。胆固醇缀合可以自发地将修饰的核酸和肽插入脂质双分子层并随后被细胞摄取^[60]。这种膜靶向策略特别有助于增强 NA 抑制剂的抗病毒功效, 因为它们会抑制受感染细胞表面的 NA 活性, 从而阻断后代病毒的释放和传播^[61]。2021 年, Lv 等^[62]发现 ZNV-胆固醇结合物 (**40**, 图 16B) 是一种长效 NA 抑制剂, 其对耐药性流感病毒具有强效作用 (A/California/07/2009 H1N1, 对被感染小鼠单次给药或多次给药后小鼠 100% 存活)。与 ZNV ($t_{1/2}$ = 0.3 h, 大鼠) 相比, **40** 的抗病毒活性和血浆半衰期 ($t_{1/2}$ = 7.6 h, 大鼠) 得到显著改善。**40** 的单剂量给药可保护小鼠免受携带 OSV 抗性 H275Y 的野生型或突变型 H1N1 流感病毒的致命攻击。机制研究证实, 结合物靶向细胞膜并进入宿主细胞, 从而抑制 NA 功能和后代病毒颗粒的组装。因此, 该研究证明了胆固醇结合可能是改善小分子药物药代动力学和疗效的有效策略。

恩夫韦肽 (enfuvirtide, T20) 是靶向 CHR 的一种多肽衍生类药物, 是目前唯一获得 FDA 批准的病毒膜融合抑制剂, 已用于 HIV-1 的联合治疗^[63]。然而, 它的抗病毒活性较低, 且已发现部分突变毒株对其具有耐药性, 亟待开发新一代抗病毒膜融合的脂肽抑制剂 (HIV fusion-inhibitory lipopeptide)。2022 年, Xue 等^[64]以 T20 为先导化合物, 运用胆固醇缀合策略开发出了脂肽抑制剂 LP-97 (**41**) 和 LP-98 (**42**, 图 16C), 其在体外和体

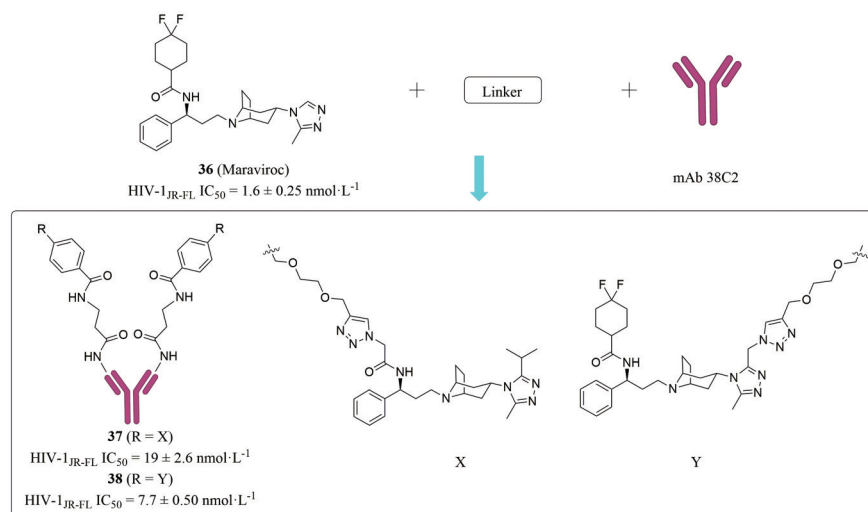


Figure 15 Chemical structures of **36**–**38**

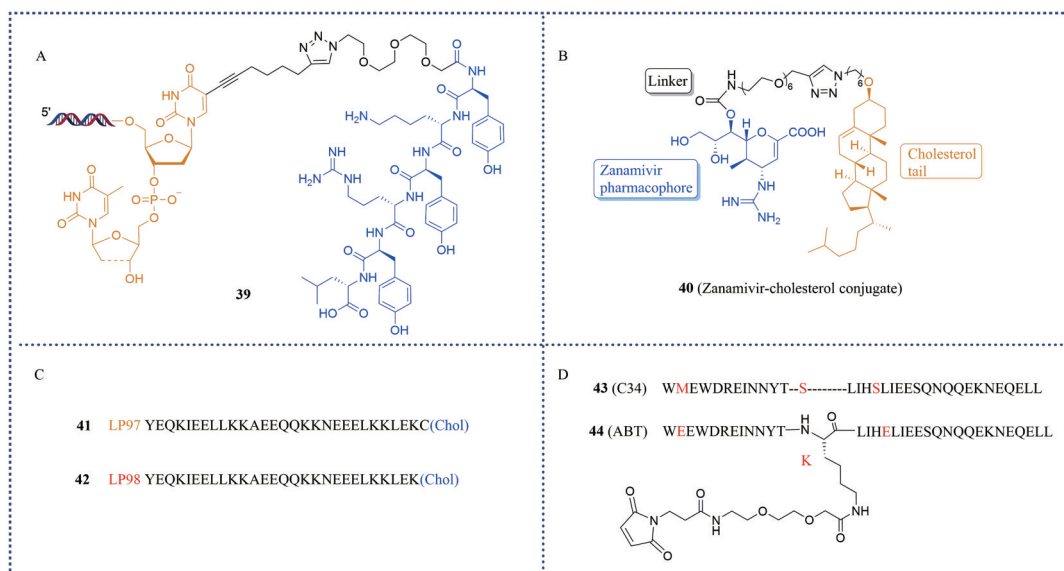


Figure 16 Chemical structures of 39 (A), 40 (B), 41 and 42 (C), 43 and 44 (D)

内都表现出高效且持久的抗病毒活性, IC_{50} 值范围为 $0.28 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 至 $7.31 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验结果表明, 使用低剂量 **42** 的单一疗法可显著降低病毒载量并维持长期病毒抑制。此外, **42** 的预给药完全阻断了直肠和阴道内病毒的感染。总之, 胆固醇缀合作为一种有效的 HIV 治疗或预防策略具有巨大潜力。

4.3 人血清白蛋白载药 人血清白蛋白 (human serum albumin, HSA) 是血清中含量最多的蛋白质 (人血清中含量为 $30 \sim 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 它是人体内各种分子的天然转运体^[65]。作为人体血液中的蛋白质, 它具有体内稳定、安全无毒、低免疫原性、生物可降解、易于纯化且水溶性较好等优势。小分子药物与 HSA 的非共价结合可保护自身免受酶促降解和肾脏清除, 从而延长体内半衰期^[66]。因此, HSA 是一种理想的药物载体, 用于靶向递送和改善药物的药代动力学特征。

用于 HIV 治疗的膜融合抑制剂 T20 为肽类药物, 通常在体内半衰期短 ($t_{1/2} = 3.46 \sim 4.35 \text{ h}$), 需要频繁注射^[67]。因此, 利用新策略以开发长效抗 HIV 肽类药物具有重要意义。以 C34 (**43**, 图 16D) 序列为模板设计的 3-马来酰亚胺基丙酸 (3-maleimidopropionic acid, MPA) 修饰肽, 即艾博卫泰 (albuviride, ABT, **44**, 图 16D), 2018 年作为新型抗 HIV 肽类药物在中国获批, 其中第 13 个残基丝氨酸 (S) 被赖氨酸 (K) 取代, 进而可以在该位置进行单个 MPA 的修饰。另外两个非靶标结合残基被谷氨酸取代, 以提高溶解度、稳定性和抗病毒活性。结果表明, **44** 不可逆地与 HSA 结合并延长其半衰期。**44** 可以与靶序列形成稳定的螺旋结构, 有效阻断 6-HB ($EC_{50} = 0.82 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 HIV-1 Env ($EC_{50} = 1.27 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 介

导的细胞-细胞膜融合过程。值得注意的是, **44** 可以抑制各种 HIV-1 亚型和突变体进入细胞, 且对 T20 耐药的 HIV-1 毒株也非常有效^[67]。此外, 一项 III 期临床试验 (TALENT 研究) 表明, 可注射的长效 HIV-1 药物 **44** 与利托那韦增强的洛匹那韦 (LPV/r) 联合使用既安全又有效^[68]。因此, **44** 的发现表明 HSA 作为一种药物载体可用于开发长效抗病毒药物。

5 核糖核酸酶靶向嵌合体

目前研究发现, mRNA、miRNA 和长链非编码 RNA 等与多种疾病的发病机制相关^[69]。研究人员常使用反义寡核苷酸 (antisense oligonucleotide, ASO) 和 siRNA 来靶向降解 RNA。虽然目前已有多种该类药物 (例如 inotersen、nusinersen、patisiran 等) 在临床应用, 但它们仍存在细胞摄取差、组织特异性递送低 (肝和肾除外)、体内逃逸差以及可能产生特异性毒性等问题^[70,71]。因此, 开发靶向 RNA 又不受寡核苷酸疗法限制的新技术, 是未来开发靶向 RNA 药物的重中之重。

核糖核酸酶 L (ribonuclease L, RNase L) 可切割降解入侵细胞的 RNA, 是先天性免疫反应的一部分。它在所有细胞中作为无活性单体以低水平表达, 在病毒感染期间被激活并二聚化以发挥作用, 且该过程具有固有的底物特异性^[72]。基于 RNase L 的生物学功能, 研究人员开发了靶向降解 RNA 的 RIBOTAC 技术^[73]。RIBOTAC 分子由一个与 RNA 结合的小分子, 一个招募 RNase L 的小分子及连接二者的 linker 三部分组成 (图 17), 它的功能是将 RNase L 募集到基因组以产生选择性切割降解的效果^[74]。因此, RIBOTAC 的靶向降解可以刺激局部免疫反应以清除细胞中的 RNA。

RIBOTAC作为一种新型分子,具有靶向不同类型RNA的潜能,与ASO和siRNA相比优势在于^[75]: ① 更好的药代动力学性质: 作为小分子, RIBOTAC相较于ASO和siRNA更易进入组织; ② 具有催化特性: RIBOTAC结合并诱导一个RNA降解后,可以结合另一个RNA,这样,低浓度的RIBOTAC就可以实现目标RNA的降解。

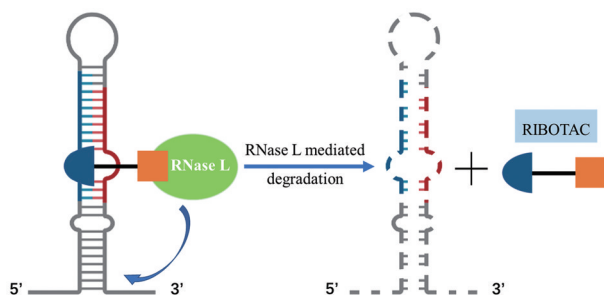


Figure 17 A mechanistic overview of RIBOTAC-mediated RNA degradation. RNase L: Ribonuclease L; RIBOTAC: Ribonuclease targeting chimera

2020年, Haniff等^[76]基于化合物C5 ($K_D = 11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **45**, 图18A)设计了一种靶向SARS-CoV-2 RNA基因组功能结构的生物活性小分子C5-RIBOTAC (**46**, 图18A)。SARS-CoV-2基因组结构分析显示, 移码元件(frameshifting element, FSE)中存在结构趋同的位点, 其控制着病毒复制的关键蛋白(pp1a, pp1ab多聚蛋白)的翻译。研究表明, **45**可以结合并稳定FSE, 进而显著抑制SARS-CoV-2 FSE的移码能力。因此, 研究人员

以**45**作为与RNA结合的小分子, 通过linker连接招募RNase L的小分子得到RNA降解剂**46**。实验结果显示, 基于RIBOTAC的多特异性策略将**45**的抗病毒活性提高了至少10倍(不同指标评估的综合结果)。机制验证表明, **46**通过引起整个SARS-CoV-2 RNA降解而发挥效应, 且降解过程依赖RNase L。综上, 该研究表明RIBOTAC有望成为开发病毒RNA基因组降解剂的新方向。

G-四链体(G-quadruplex)是SARS-CoV-2 RNA基因组的重要组成部分, β 冠状病毒假结(beta-coronaviral pseudoknot)对于SARS-CoV-2复制过程至关重要^[74]。鉴于这两种寡核苷酸的关键作用, 2023年Mikutis等^[77]分别以靶向G-四链体的PDS (**47**, $K_D = 26 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图18B)和靶向 β 冠状病毒假结的MTDB (**48**, $K_D = 56.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图18B)为先导, 通过PEG链连接RNA降解弹头咪唑基, 设计了两个RIBOTAC **49** ($K_D = 137 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图18B)和**50** ($K_D = 16.6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图18B)。研究表明, **49**不仅在体外可以结合并降解G-四链体, 还能够以浓度依赖的方式减少病毒复制($\text{IC}_{50} = 1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 同样, **50**在体外可以结合并降解其靶RNA, 且在低微摩尔浓度下表现出显著的抗病毒作用。此外, **50**能够抑制SARS-CoV-2在小鼠体内的复制。该研究证明了RIBOTAC在体内既耐受又有效, 并具有治疗病毒感染的潜力。

6 其他双功能小分子

除上述基于多特异性结合的抗病毒药物研究实例

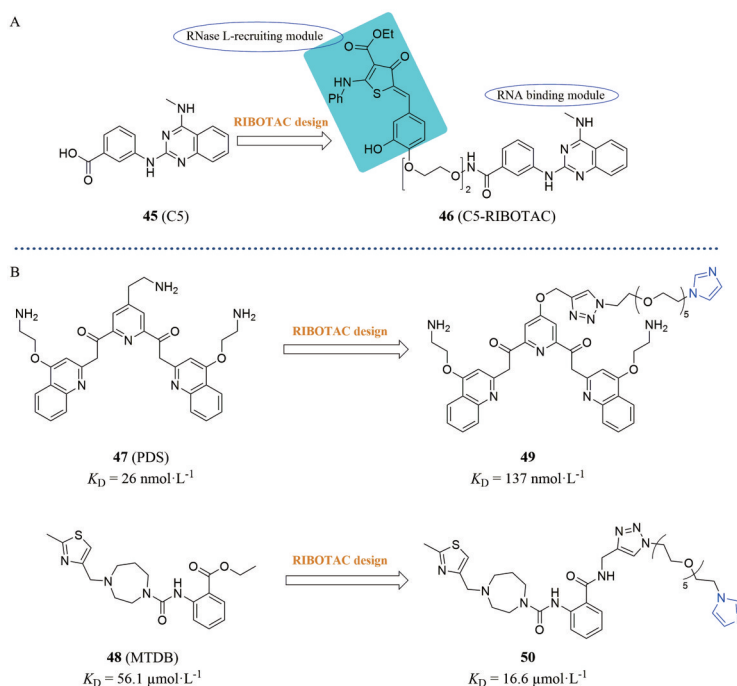


Figure 18 Chemical structures of **45** and **46** (A), **47**–**50** (B)

外,还有以下几种新颖的双功能靶向抗病毒小分子化合物。

2019年, Rashad等^[78]以gp120蛋白拮抗剂和宿主细胞辅助受体(coreceptor, CoR)蛋白拮抗剂可以共价结合为基本假设,设计了可提高抗HIV活性的双功能协同分子LJC240-L4-UM15 (Bal.01, $IC_{50} = 0.359 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **51**, 图19A),即将CCR5小分子拮抗剂LJC240和gp120肽三唑拮抗剂UM15共价结合以形成双功能嵌合体。与两种抑制剂的非共价混合物相比, **51**保留了单个成分的特异性靶向功能,同时在抑制不同假病毒的细胞感染方面表现出低至亚纳摩尔的效力 (Bal.01, $IC_{50} = 0.359 \pm 0.05 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; JRFL, $IC_{50} = 4 \pm 0.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; YU2, $IC_{50} = 4.8 \pm 0.008 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),这大大高于单个成分的非共价混合物的效力 (JRFL, $IC_{50} = 34 \pm 3.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此,这项工作表明双功能嵌合体能够参与并协同阻断宿主细胞和病毒膜融合的过程。

化合物 BNM-III-170 (Bal. 01, $IC_{50} = 0.73 \pm 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **52**, 图19B)是一个小分子CD4模拟物,其能够与HIV-1 Env糖蛋白中的gp120亚基结合。2021年, Gaffney等^[79]将**52**与能够和gp41亚基结合的含有三个色氨酸的多肽(Trp3) 偶联,设计并合成了一类可同时结合gp120和gp41的双功能HIV-1抑制剂BNM-L7-Trp3 (Bal. 01, $IC_{50} = 0.58 \pm 0.09 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50} = 7.2 \pm 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, **53**, 图19B)。ELISA表明,单独使用**52**能够有效抑制病毒对细胞的感染,而单独使用Trp3则不能起到抑制病毒感染的效果,且只有二者共价连接形成的**53**才能够诱导病毒的水解。此外,分子模拟证明,**52**具有嵌入病毒膜结构的倾向,并协同Trp3对病毒膜结构产生破坏作用,因此这可能是双功能抑制剂产生非特异性病毒水解效应的潜在原因。最后,研究发现双功能抑制剂还能有效清除被HIV-1感染的细胞,从而起到治疗艾滋病的效果。

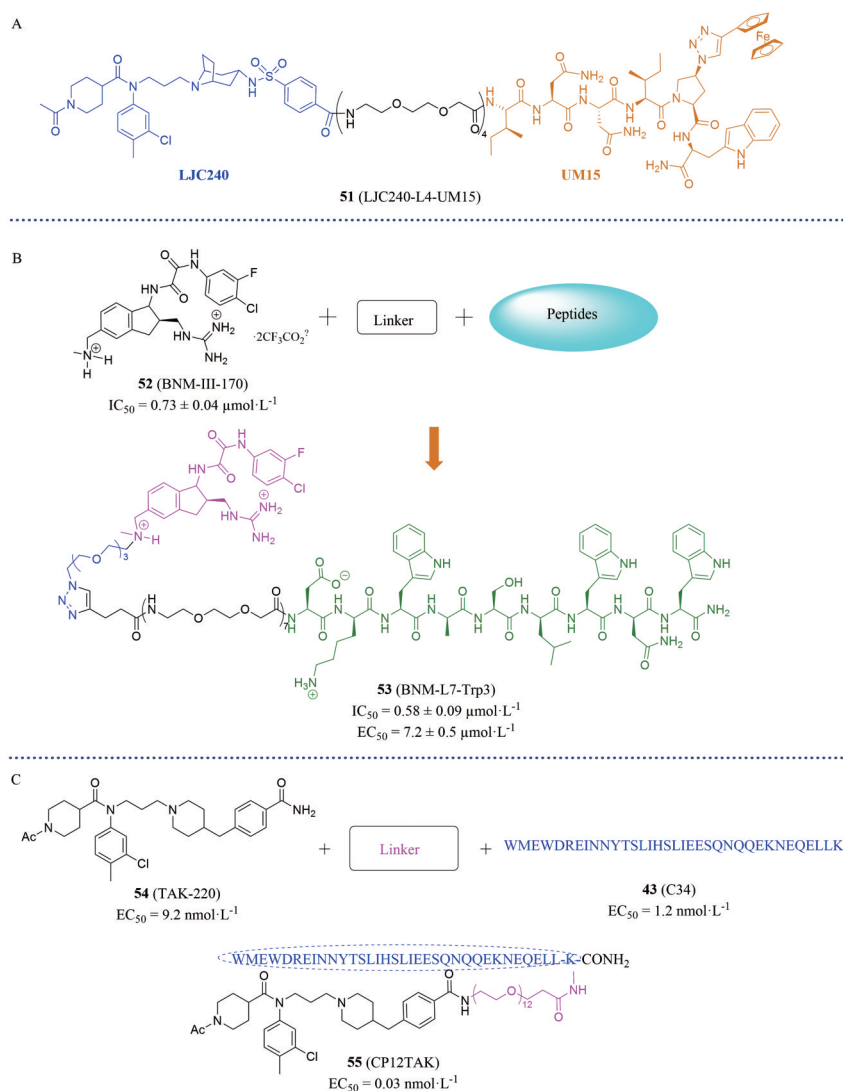


Figure 19 Chemical structures of **51** (A); **52**, **53** (B); **43**, **54**, **55** (C)

2021年, Wang等^[80]报道了一种HIV-1双功能进入抑制剂, 该分子由哌啶-4-甲酰胺类CCR5拮抗剂TAK-220 ($EC_{50} = 9.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **54**, 图19C) 和靶向gp41 NHR的融合抑制肽C34 ($EC_{50} = 1.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **43**, 图19C) 组成。合成的嵌合体是通过将两个药效载体与聚乙二醇链连接而构建的。其中一个嵌合体CP12TAK ($EC_{50} = 0.03 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, **55**, 图19C) 表现出了异常强大的抗病毒活性, 分别是**43**和**54**的40倍和306倍。除R5型病毒外, **55**还能强烈抑制X4型HIV-1毒株的感染。这些数据表明**55**作为一种新机制的抗HIV-1药物, 值得进一步开发。同时也表明, 多特异性结合策略有望推广到抗其他Env病毒感染的治疗中。

7 总结与展望

艾滋病和乙型肝炎等慢性感染性疾病, 以及埃博拉病毒和SARS-CoV-2等新型病毒的出现, 凸显了运用新策略开发高效低毒的抗病毒药物的必要性。多特异性结合策略是对抗致病病毒的有效武器, 本文总结了近年来其在抗病毒领域的应用。PROTAC、ARM、ADC、抗病毒药物递送和RIBOTAC等多特异性结合策略已被用于发现新的药物实体, 以增强抗病毒效力, 解决耐药性问题^[81-83]。

然而, 这些策略也有一些局限性。PROTAC必须穿过细胞膜才能实现细胞内蛋白质降解, 但大分子量往往伴随着有限的水溶性和细胞渗透性, 导致生物利用度低。同时, RIBOTAC也因其通常具有较大的分子量而面临成药性不足的问题。其次, 内源性抗体种类较少是设计ARM药物的一大难题, ADC药物生产难度大也成为了研发ADC药物的一大壁垒。此外, 在核酸递送策略中, 寡核苷酸由于固有的代谢不稳定性难以进入临床研究, 胆固醇缀合分子口服生物利用度较差以及HSA载药效率低、适用性有限等是实现药物靶向递送亟待解决的问题。

HIV整合酶、HIV RNase H和流感核酸内切酶等金属酶也是一大类抗病毒靶标, 其通常具有膜渗透性差和细胞活性差的缺点^[84]。此外, HIV RNase H具有较浅的配体结合位点, 是“不可成药”的靶标。上述缺点均有望运用靶向蛋白降解策略来克服。对于ARM策略, 在先导化合物上定位不同的连接位点进而连接内源性抗体可以增加ARM设计的多样性。此外, 每个HSA分子只能连接少量药物分子, 且载药能力很大程度上受限于药物的理化性质, 但可以将药物包裹在HSA内制备成HSA纳米颗粒, 直到在靶标部位被释放, 从而提高治疗效果。值得期待的是, 多种多特异性结合策略联用, 有望解决其成药性差等问题。例如, PROTAC和RIBOTAC可运用HSA载药系统进行药物

递送, 改善药物代谢动力学性质。

考虑到病毒的高度变异性和致病机制的复杂性, DNA编码化学技术^[85]、基因组编辑技术^[86]、核酸适配体技术^[87-90]和基于蛋白质自组装的配体^[91]有望得到应用, 为开发强效抗病毒药物提供参考。此外, 以抗病毒药物靶标和计算化学(例如三元复合物的预测)为重点的结构生物学的发展将极大地促进PROTAC抗病毒分子的设计^[92-94]。同时, 天然产物具有复杂的结构和多样的药理活性, 为发现新型抗病毒药物提供了丰富资源。例如, Tat蛋白在HIV-1的转录中发挥重要作用, 天然产物雷公藤甲素可作为Tat降解剂通过蛋白酶体途径降低Tat蛋白水平, 对HIV-1复制表现出皮摩尔至纳摩尔级别的抑制活性^[95]。

将药物化学与生物信息学、人工智能技术相结合, 可对已上市药物进行高通量表型筛选和反向药效团匹配虚拟筛选, 探索新的适应症。此外, 快速药物筛选系统的建立以及可靠的安全性和有效性评价体系也将加速抗病毒药物的开发进程。

随着多特异性结合策略的迅速发展, 更高活性且成药性良好的抗病毒药物将被报道。这将有助于新型抗病毒药物分子的开发, 以应对现有的病毒感染以及新病毒的暴发。

作者贡献: 周洋、徐淑静负责全文的撰写; 丁当、王硕负责文章的修改; 刘新泳、展鹏对论文进行整体的指导和修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease [J]. PLoS Pathog, 2020, 16: e1008536.
- [2] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20: 315.
- [3] Gottlieb MS. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 1981, 30: 250-252.
- [4] Hutchinson EC. Influenza virus [J]. Trends Microbiol, 2018, 26: 809-810.
- [5] Shih C, Yang CC, Chojjilsuren G, et al. Hepatitis B virus [J]. Trends Microbiol, 2018, 26: 386-387.
- [6] Jacob ST, Crozier I, Fischer WA 2nd, et al. Ebola virus disease [J]. Nat Rev Dis Primers, 2020, 6: 13.
- [7] Wang P, Nair MS, Liu L, et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7 [J]. Nature, 2021, 593: 130-135.
- [8] Blassel L, Zhukova A, Villabona-Arenas CJ, et al. Drug resistance mutations in HIV: new bioinformatics approaches and challenges [J]. Curr Opin Virol, 2021, 51: 56-64.
- [9] Papatheodoridis GV, Deutsch M. Resistance issues in treating

- chronic hepatitis B [J]. *Future Microbiol*, 2008, 3: 525-538.
- [10] Deshaies RJ. Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation [J]. *Nature*, 2020, 580: 329-338.
- [11] Wang Y, Yang S. Multispecific drugs: the fourth wave of biopharmaceutical innovation [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 86.
- [12] Zhong X, D'Antona AM. Recent advances in the molecular design and applications of multispecific biotherapeutics [J]. *Antibodies (Basel)*, 2021, 10: 13.
- [13] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 8554-8559.
- [14] Li X, Pu W, Zheng Q, et al. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21: 99.
- [15] Kannt A, Dikic I. Expanding the arsenal of E3 ubiquitin ligases for proximity-induced protein degradation [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28: 1014-1031.
- [16] Jevtic P, Haakonsen DL, Rape M. An E3 ligase guide to the galaxy of small-molecule-induced protein degradation [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28: 1000-1013.
- [17] Chen Y, Tandon I, Heelan W, et al. Proteolysis-targeting chimera (PROTAC) delivery system: advancing protein degraders towards clinical translation [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51: 5330-5350.
- [18] Schapira M, Calabrese MF, Bullock AN, et al. Targeted protein degradation: expanding the toolbox [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 949-963.
- [19] Paiva SL, Crews CM. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2019, 50: 111-119.
- [20] Gabizon R, Shraga A, Gehrtz P, et al. Efficient targeted degradation *via* reversible and irreversible covalent PROTACs [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 11734-11742.
- [21] Li K, Crews CM. PROTACs: past, present and future [J]. *Chem Soc Rev*, 2022, 51: 5214-5236.
- [22] Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, et al. Drugging the "undruggable" cancer targets [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 502-508.
- [23] Sun Y, Zhao X, Ding N, et al. PROTAC-induced BTK degradation as a novel therapy for mutated BTK C481S induced ibrutinib-resistant B-cell malignancies [J]. *Cell Res*, 2018, 28: 779-781.
- [24] Buhimschi AD, Armstrong HA, Toure M, et al. Targeting the C481S ibrutinib-resistance mutation in bruton's tyrosine kinase using PROTAC-mediated degradation [J]. *Biochemistry*, 2018, 57: 3564-3575.
- [25] Montrose K, Krissansen GW. Design of a PROTAC that antagonizes and destroys the cancer-forming X-protein of the hepatitis B virus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453: 735-740.
- [26] Poveda E, García F. Resistencia a telaprevir [telaprevir resistance] [J]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2013, 31 Suppl 3: 26-32.
- [27] Muir AJ. Telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C infection [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2011, 9: 1105-1114.
- [28] de Wispelaere M, Du G, Donovan KA, et al. Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3468.
- [29] Li H, Wang S, Ma W, et al. Discovery of pentacyclic triterpenoid PROTACs as a class of effective hemagglutinin protein degraders [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 7154-7169.
- [30] Xu Z, Liu X, Ma X, et al. Discovery of oseltamivir-based novel PROTACs as degraders targeting neuraminidase to combat H1N1 influenza virus [J]. *Cell Insight*, 2022, 1: 100030.
- [31] Zhao J, Wang J, Pang X, et al. An anti-influenza A virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 2079.
- [32] Jiang L, Wen C, Zhou H, et al. Cyclin-dependent kinase 7/9 inhibitor SNS-032 induces apoptosis in diffuse large B-cell lymphoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2022, 23: 319-327.
- [33] Hahn F, Hamilton ST, Wangen C, et al. Development of a PROTAC-based targeting strategy provides a mechanistically unique mode of anti-cytomegalovirus activity [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 12858.
- [34] Liang CY, Xin L, Tian L, et al. Protacs based on VHL ligand targeting coronavirus 3CL protease and preparation method and application thereof: US, 11518759B1 [P]. 2022-12-06.
- [35] Liang CY, Xin L, Tian L, et al. Protacs targeting coronavirus 3CL protease and preparation method and application thereof: US, 11530195B1 [P]. 2022-12-20.
- [36] Wang X, Chen H, Chiodo F, et al. Detection of human IgM and IgG antibodies by means of galactofuranose-coated and rhamnose-coated gold nanoparticles [J]. *Matters*, 2019, 5: e201908000004.
- [37] Jakobsche CE, Parker CG, Tao RN, et al. Exploring binding and effector functions of natural human antibodies using synthetic immunomodulators [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 2404-2411.
- [38] Oostindie SC, van der Horst HJ, Lindorfer MA, et al. CD20 and CD37 antibodies synergize to activate complement by Fc-mediated clustering [J]. *Haematologica*, 2019, 104: 1841-1852.
- [39] Gray MA, Tao RN, DePorter SM, et al. A nanobody activation immunotherapeutic that selectively destroys HER2-positive breast cancer cells [J]. *Chembiochem*, 2016, 17: 155-158.
- [40] Rathmann SM, Genady AR, Janzen N, et al. A versatile platform for the development of radiolabeled antibody-recruiting small molecules [J]. *Mol Pharmaceutics*, 2021, 18: 2647-2656.
- [41] Castellano G, Woltman AM, Schlagwein N, et al. Immune modulation of human dendritic cells by complement [J]. *Eur J Immunol*, 2007, 37: 2803-2811.
- [42] Junker F, Gordon J, Qureshi O. Fc gamma receptors and their role in antigen uptake, presentation, and t cell activation [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1393.
- [43] Golay J, Taylor RP. The role of complement in the mechanism of action of therapeutic anticancer mAbs [J]. *Antibodies*, 2020, 9: 58.

- [44] Vogelpoel LT, Baeten DL, de Jong EC, et al. Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 79.
- [45] Krambovitis E, Porichis F, Spandidos DA. HIV entry inhibitors: a new generation of antiretroviral drugs [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 1165-1173.
- [46] Kazmierski WM, Kenakin TP, Gudmundsson KS. Peptide, peptidomimetic and small-molecule drug discovery targeting HIV-1 host-cell attachment and entry through gp120, gp41, CCR5 and CXCR4 [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2006, 67: 13-26.
- [47] Parker CG, Domaoal RA, Anderson KS, et al. An antibody-recruiting small molecule that targets HIV gp120 [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 16392-16394.
- [48] Parker CG, Dahlgren MK, Tao RN, et al. Illuminating HIV gp120-ligand recognition through computationally-driven optimization of antibody-recruiting molecules [J]. *Chem Sci*, 2014, 5: 2311-2317.
- [49] Liu X, Zhang B, Wang Y, et al. A universal dual mechanism immunotherapy for the treatment of influenza virus infections [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5597.
- [50] Zhu GD, Fu YX. Design of next generation antibody drug conjugates [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2013, 48: 1053-1070.
- [51] Gavriluyk J, Uehara H, Otsubo N, et al. Potent inhibition of HIV-1 entry with a chemically programmed antibody aided by an efficient organocatalytic synthesis [J]. *Chembiochem*, 2010, 11: 2113-2118.
- [52] Sato S, Inokuma T, Otsubo N, et al. Chemically programmed antibodies AS HIV-1 attachment inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4: 460-465.
- [53] Asano S, Gavriluyk J, Burton DR, et al. Preparation and activities of macromolecule conjugates of the CCR5 antagonist Maraviroc [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5: 133-137.
- [54] Regeneron Pharmaceuticals. Protein-antiviral compound conjugates: WO, 2021/151031A1 [P]. 2021-07-29.
- [55] Cidara Therapeutics. Protein-drug conjugates for antiviral therapy: WO, 2022/192685A1 [P]. 2022-09-15.
- [56] DeGrace MM, Ghedin E, Frieman MB, et al. Defining the risk of SARS-CoV-2 variants on immune protection [J]. *Nature*, 2022, 605: 640-652.
- [57] Maillard PV, van der Veen AG, Poirier EZ, et al. Slicing and dicing viruses: antiviral RNA interference in mammals [J]. *EMBO J*, 2019, 38: e100941.
- [58] Alshaer W, Zureigat H, Al Karaki A, et al. siRNA: mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 905: 174178.
- [59] Traube FR, Stern M, Tolke AJ, et al. Suppression of SARS-CoV-2 replication with stabilized and click-chemistry modified siRNAs [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202204556.
- [60] Tai W, Zhao P, Gao X. Cytosolic delivery of proteins by cholesterol tagging [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabb0310.
- [61] von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 967-974.
- [62] Lv X, Wang P, Li C, et al. Zanamivir-cholesterol conjugate: a long-acting neuraminidase inhibitor with potent efficacy against drug-resistant influenza viruses [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 17403-17412.
- [63] Lazzarin A. Enfuvirtide: the first HIV fusion inhibitor [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2005, 6: 453-464.
- [64] Xue J, Chong H, Zhu Y, et al. Efficient treatment and pre-exposure prophylaxis in rhesus macaques by an HIV fusion-inhibitory lipopeptide [J]. *Cell*, 2022, 185: 131-144.e18.
- [65] Matos MJ. Learning from nature: the role of albumin in drug delivery [J]. *Future Med Chem*, 2018, 10: 983-985.
- [66] Liu Z, Chen X. Simple bioconjugate chemistry serves great clinical advances: albumin as a versatile platform for diagnosis and precision therapy [J]. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 1432-1456.
- [67] Chong H, Yao X, Zhang C, et al. Biophysical property and broad anti-HIV activity of albuvirtide, a 3-maleimidopropionic acid-modified peptide fusion inhibitor [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e32599.
- [68] Su B, Yao C, Zhao QX, et al. Efficacy and safety of the long-acting fusion inhibitor albuvirtide in antiretroviral-experienced adults with human immunodeficiency virus-1: interim analysis of the randomized, controlled, phase 3, non-inferiority TALENT study [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2020, 133: 2919-2927.
- [69] Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003, 67: 657-685.
- [70] Yu AM, Tu MJ. Deliver the promise: RNAs as a new class of molecular entities for therapy and vaccination [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230: 107967.
- [71] Setten RL, Rossi JJ, Han SP. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 421-446.
- [72] Costales MG, Matsumoto Y, Velagapudi SP, et al. Small molecule targeted recruitment of a nuclease to RNA [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 6741-6744.
- [73] Costales MG, Suresh B, Vishnu K, et al. Targeted degradation of a hypoxia-associated non-coding RNA enhances the selectivity of a small molecule interacting with RNA [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26: 1180-1186.e5.
- [74] Costales MG, Aikawa H, Li Y, et al. Small-molecule targeted recruitment of a nuclease to cleave an oncogenic RNA in a mouse model of metastatic cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 2406-2411.
- [75] Dey SK, Jaffrey SR. RIBOTACs: small molecules target RNA for degradation [J]. *Cell Chem Biol*, 2019, 26: 1047-1049.
- [76] Haniff HS, Tong Y, Liu X, et al. Targeting the SARS-CoV-2 RNA genome with small molecule binders and ribonuclease

- targeting chimera (RIBOTAC) degraders [J]. ACS Cent Sci, 2020, 6: 1713-1721.
- [77] Mikutis S, Rebelo M, Yankova E, et al. Proximity-induced nucleic acid degrader (PINAD) approach to targeted RNA degradation using small molecules [J]. ACS Cent Sci, 2023, 9: 892-904.
- [78] Rashad AA, Song LR, Holmes AP, et al. Bifunctional chimera that coordinately targets human immunodeficiency virus 1 envelope gp120 and the host-cell CCR5 coreceptor at the virus-cell interface [J]. J Med Chem, 2018, 61: 5020-5033.
- [79] Gaffney A, Nangarla A, Ang CG, et al. HIV-1 Env-dependent cell killing by bifunctional small-molecule/peptide conjugates [J]. ACS Chem Biol, 2021, 16: 193-204.
- [80] Wang C, Wang X, Wang H, et al. A "two-birds-one-stone" approach toward the design of bifunctional human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors targeting the CCR5 coreceptor and gp41 N-terminal heptad repeat region [J]. J Med Chem, 2021, 64: 11460-11471.
- [81] Xu S, Ding D, Zhang X, et al. Newly emerging strategies in antiviral drug discovery [J]. Molecules, 2022, 27: 850.
- [82] Xu S, Ding D, Liu X, et al. Universal strategies and methodologies in broad-spectrum antiviral drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1289-1300.
- [83] Xu S, Ding D, Liu X, et al. Integrated medicinal chemistry: new modalities and methodologies in drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 2889-2901.
- [84] O'Herin CB, Moriuchi YW, Bemis TA, et al. Development of Human carbonic anhydrase II heterobifunctional degraders [J]. J Med Chem, 2023, 66: 2789-2803.
- [85] Chamakuri S, Lu S, Ucisik MN, et al. DNA-encoded chemistry technology yields expedient access to SARS-CoV-2 M(pro) inhibitors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118: e2111172118.
- [86] Doudna JA. The promise and challenge of therapeutic genome editing [J]. Nature, 2020, 578: 229-236.
- [87] Chen XF, Zhao X, Yang Z. Aptamer-based antibacterial and antiviral therapy against infectious diseases [J]. J Med Chem, 2021, 64: 17601-17626.
- [88] Nguyen PDM, Zheng J, Gremminger TJ, et al. Binding interface and impact on protease cleavage for an RNA aptamer to HIV-1 reverse transcriptase [J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48: 2709-2722.
- [89] Musumeci D, Riccardi C, Montesarchio D. G-Quadruplex forming oligonucleotides as anti-HIV agents [J]. Molecules, 2015, 20: 17511-17532.
- [90] Duclair S, Gautam A, Ellington A, et al. High-affinity RNA aptamers against the HIV-1 protease inhibit both *in vitro* protease activity and late events of viral replication [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2015, 4: e228.
- [91] Tauber C, Wamser R, Arkona C, et al. Chemical evolution of antivirals against enterovirus D68 through protein-templated knoevenagel reactions [J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2021, 60: 13294-13301.
- [92] Li W, Zhang J, Guo L, et al. Importance of three-body problems and protein-protein interactions in proteolysis-targeting chimera modeling: insights from molecular dynamics simulations [J]. J Chem Inf Model, 2022, 62: 523-532.
- [93] Desantis J, Mercorelli B, Celegato M, et al. Indomethacin-based PROTACs as pan-coronavirus antiviral agents [J]. Eur J Med Chem, 2021, 226: 113814.
- [94] Shaheer M, Singh R, Sobhia ME. Protein degradation: a novel computational approach to design protein degrader probes for main protease of SARS-CoV-2 [J]. J Biomol Struct Dyn, 2021, 40: 10905-10917.
- [95] Jin H, Li D, Lin MH, et al. Tat-based therapies as an adjuvant for an HIV-1 functional cure [J]. Viruses, 2020, 12: 415.